

Title	Crystal Structure of the MexAB-OprM Efflux Pump Subunits, MexA and OprM, of Pseudomonas aeruginosa
Author(s)	赤間, 浩之
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46428
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について ご参照 ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名	あか ま ひろ ゆき 赤 間 浩 之
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	第 1 9 7 3 5 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 17 年 6 月 20 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	Crystal Structure of the MexAB-OprM Efflux Pump Subunits, MexA and OprM, of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (緑膿菌の異物・抗生物質排出ポンプサブユニット MexA 及び OprM の結晶構造解析)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 中 川 敦 史 (副査) 教 授 月 原 富 武 教 授 原 田 明 教 授 後 藤 祐 児

論 文 内 容 の 要 旨

緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) は院内感染の起因菌の一つで、しばしば社会的にも問題となっている。複数の抗生物質に耐性を示す本菌は免疫力が低下した患者等に感染を起こし、時として彼らの生命を脅かす。緑膿菌の多剤耐性にかかわる因子は数多く知られているが、特に問題になるのは細胞内に浸入して来た薬剤を細胞外に運び出す排出ポンプの存在である。この薬剤排出機構の解明は多剤耐性緑膿菌に対する治療薬の開発の基礎となるばかりではなく、膜を介した物質輸送・解毒など様々な学術的及び医学的に興味深い現象の理解につながる。例えば、本菌が発現する排出ポンプの多くは構造及び作用機作の異なった抗生物質を輸送するが、この機序は複数の基質認識部位を持った膜蛋白質の解明につながる。この認識機構の解明によって、膜を介した物質輸送の制御に広い応用が期待できる。

MexAB-OprM は緑膿菌がコードする RND (resistance nodulation cell division) 型排出ポンプの一種であり、野生型の緑膿菌では恒常的に発現されているが、菌が抗生物質に曝されることによって大量に発現される。MexB サブユニットは原形質膜 (内膜) を 12 回貫通しており、これで薬剤 (基質) を認識し、プロトン勾配のエネルギーを使って、それを外膜サブユニットへ送る。OprM は外膜に存在し、MexB から薬剤を受け取り、管を形成することによって薬剤を菌体外へ排出するものと考えられている。MexA は内膜にアンカーし、その蛋白質部分のほとんどが膜間領域に存在するが、その機能・構造は共に未知であった。本研究はこのような MexA 及び OprM サブユニットの結晶構造を決定し、薬剤耐性機構の解明及び排出ポンプ阻害剤の開発等に寄与することを目的とした。

MexA は、全アミノ酸 (369 残基) の 68.3% にあたる 252 残基の構造を決定した。およそ鎌形をしたモノマー構造は大きく三つのドメインに分けられた。それぞれのドメインに含まれた二次構造から α -domain、 β -domain 及び $\alpha + \beta$ -domain とした。369 残基のうち 117 残基について電子密度は観察できたがトレースできなかった。しかし、ドメイン構造が伺えたので、ここを四つ目の disorder domain とした。全体として新規の構造とされた。ドメイン単位では、三次元構造比較に使用されるプログラム SCOP で β -domain と $\alpha + \beta$ -domain にそれぞれで類似構造 (module) が見られた。

OprM は、全アミノ酸の 97.4% にあたる 456 残基の構造を決定した。生物学的な機能単位はおおよそ円筒状の三量体構造であった。決定した構造は大きく二つの領域に分けられ、外膜貫通領域を β -barrel、膜間領域の部分を α -barrel とした。一見、大腸菌の異物排出チャネル TolC と類似しているように見えたが、細部の構造が異なっていた。OprM

のアミノ末端は外膜にアンカーしており、脂肪鎖の一部の電子密度が Cys1 の先に観察された。また、円筒構造の膜間側は完全に閉塞状態であった。この閉塞状態は三量体を形成する単量体それぞれの Leu412 が集合し、疎水的な相互作用をすることにより形成されていた。一方、外膜側には 6~8Å の開口部があった。

In vivo では MexA は単量体で働き、MexB や OprM と共に複合体を作ると考えられるが、結晶中では 13 量体で非対称単位を形成していた。そこで、「結晶化した 13 量体を利用したもの」と「MexA の生化学実験から算出した分子の数」の二通りを使って、二種類の複合体モデルを提案した。

論文審査の結果の要旨

申請者は、緑膿菌の薬物耐性に密接に関連する、多剤性薬剤排出タンパク質複合体 MexAB-OprM の構造解明を目指して、2つのタンパク質サブユニット MexA および OprM の結晶構造解析を行った。緑膿菌は院内感染の起因菌の一つで、複数の抗生物質に対して抵抗性を示す本菌は、免疫力が低下した患者等に感染を起こし、時として死に至らせるために、その薬剤耐性機構の解明は重要である。緑膿菌の多剤耐性にかかわる因子は数多く知られているが、特に問題になるのは細胞内に浸入して来た薬剤を細胞外に運び出す排出ポンプの存在であり、MexAB-OprM 複合体はその中心となるものである。

MexA、OprM は、いずれも膜結合タンパク質であり、大量発現、精製、結晶化は通常の水溶性タンパク質に比べて非常に困難な点が多かったが、申請者は、原子レベルの分解能の回折データを与える良質な結晶を作成し、それぞれ 2.40、2.56 Å 分解能の原子構造を解明することに成功した。

すでに構造解析されていた MexB タンパク質の大腸菌ホモログである AcrB の構造を基に、MexB のモデルを作成し、MexA、OprM の構造と合わせ、MexAB-OprM 複合体モデルを作製した。さらに、このモデルに基づいて、MexAB-OprM 複合体による薬剤排出機構を提案している。

これらの成果は、多剤耐性緑膿菌に対する治療薬の開発の基礎となるだけでなく、膜を介した物質輸送・解毒など様々な現象の理解につながることが期待されるものであり、博士（理学）の学位に値するものであると認める。